

## Trabajo Original

PREMIO PROF. DR. ABRAHAM GUITELMAN

### La activación de receptores activados por proliferadores peroxisomales (PPAR) como reguladora del metabolismo lipídico en la placenta de pacientes con diabetes

*The activation of peroxisome proliferator activated receptors (PPARs) as the regulator of lipid metabolism in the placenta of patients with diabetes*

Dres. Evangelina Capobianco<sup>1</sup>, Nora Martínez<sup>1</sup>, Daiana Fornes<sup>1</sup>, Romina Higa<sup>1</sup>, Melisa Kurtz<sup>1</sup>, Ingrid Di Marco<sup>2</sup>, María Natalia Basualdo<sup>2</sup>, Cristina Faingold<sup>3</sup>, Alicia Jawerbaum<sup>1</sup>

<sup>1</sup>Laboratorio de Reproducción y Metabolismo, CEFYBO-CONICET, Facultad de Medicina, Universidad de Buenos Aires, Paraguay 2155, Piso 17 (1121) Ciudad Autónoma de Buenos Aires

<sup>2</sup>División Obstetricia del Hospital Materno-Infantil "Ramón Sardá", Esteban de Luca 2151 (1246) Ciudad Autónoma de Buenos Aires

<sup>3</sup>Hospital César Milstein, La Rioja 951 (1221) Ciudad Autónoma de Buenos Aires

#### Resumen

Dadas las alteraciones metabólicas inducidas por la diabetes materna y la capacidad de los receptores nucleares PPAR de regular el metabolismo lipídico, se propuso como **objetivo** evaluar los niveles de lípidos y PPAR en la placenta de pacientes sanas y con diabetes tipo 2, y determinar si la activación de los PPAR regula los niveles y peroxidación lipídica en dichos tejidos. **Metodología:** las placentas se obtuvieron luego del alumbramiento, se determinaron los niveles de lípidos mediante cromatografía, los niveles de PPAR mediante Western blot y la peroxidación lipídica mediante la cuantificación de TBARS. **Resultados:** se evidenciaron mayores niveles de lípidos y menores niveles de PPAR $\alpha$  y PPAR $\gamma$  en placenta de pacientes diabéticas en relación con el control ( $P<0,05$ ). Los agonistas de PPAR $\alpha$  redujeron la masa lipídica en la placenta de pacientes sanas y diabéticas, mientras que la activación de PPAR $\delta$  la redujo sólo en la placenta de pacientes sanas. Al activar PPAR $\gamma$  aumenta la masa lipídica y la expresión de la enzima de síntesis de ácidos grasos FASN ( $P<0,05$ ). La peroxidación lipídica, incrementada en placenta de pacientes diabéticas ( $P<0,001$ ), se reguló negativamente al activar los tres isotipos de los PPAR ( $P<0,05$ ). **Conclusión:** se identificaron en este estudio noveles funciones de los PPAR en la placenta humana, relevantes en la regulación del metabolismo lipídico y la lipoperoxidación. La diabetes tipo 2 induce a nivel placentario alteraciones en los niveles y función de los PPAR vinculadas a las importantes anomalías en el metabolismo lipídico y un estado prooxidante inducidas por esta patología.

**Palabras clave:** receptores activados por proliferadores peroxisomales (PPAR), diabetes, placenta, lípidos, lipoperoxidación.

#### Abstract

Due to the metabolic alterations induced by maternal diabetes and the capacity of nuclear receptors PPARs to regulate lipid metabolism the **aim** of this study was to evaluate the concentrations of lipids and PPARs in the placenta from healthy and type 2 diabetic patients and to determine whether PPARs activation regulate lipid concentrations and peroxidation in these tissues. **Methods:** Placentas were obtained after delivery, lipid levels were determined by chromatography, concentrations of PPARs isotypes were evaluated by Western blot and the lipid peroxidation determined by TBARS quantification. **Results:** There are higher levels of lipids and lower concentrations of PPAR $\alpha$  and PPAR $\gamma$  in the placenta from diabetic patients when compared to controls ( $P<0.05$ ). PPAR $\alpha$  agonists decreased the lipid mass in the placenta from healthy and diabetic patients, while PPAR $\delta$  activation decreased the lipid mass only in the placenta from healthy patients. When PPAR $\gamma$  was activated, the lipid mass and the expression of the fatty acid synthase enzyme (FASN) were increased. Lipid peroxidation, increased in the placenta from diabetic patients ( $P<0.001$ ), was negatively regulated when the three PPARs were activated ( $P<0.05$ ). **Conclusion:** We identified in this work novel PPAR functions in the human placenta as relevant regulators of lipid metabolism and peroxidation. Type 2 diabetes induced in the placenta alterations in PPARs expression and function, related to the important anomalies in lipid metabolism and the pro-oxidative state induced by this pathology.

**Key words:** Peroxisome Proliferator Activated Receptors (PPARs), diabetes, placenta, lipids, lipoperoxidation.

## Introducción

La diabetes materna afecta el desarrollo fetal y placentario, por lo que se producen incrementos en los índices de abortos espontáneos, malformaciones congénitas y patologías perinatales (1,2). La macrosomía y la placentomegalia constituyen el fenotipo más frecuente en la diabetes materna (3). La macrosomía conduce a complicaciones maternas y fetales en el período perinatal y constituye un marcador fenotípico de anómala programación intrauterina, ya que conlleva a mayores índices de patologías como la hipertensión, diabetes y enfermedad coronaria en la vida adulta de la descendencia (4,5). El feto adquiere su característica macrosómica hacia fines de la gestación. Producto de la mayor secreción insulínica del páncreas fetal en respuesta a la hiperglucemia materna, se promueve en el feto un estado anabólico que conduce a una mayor acumulación de lípidos en diferentes órganos fetales, ampliamente facilitada y promovida por una mayor transferencia de lípidos a través de la placenta (3,6). La transferencia lipídica se regula en el tejido placentario. Los ácidos grasos provenientes de la circulación materna son reesterificados en forma transiente en este tejido, y luego catabolizados mediante la acción de lipasas para luego ser transferidos al feto en desarrollo (7). Los receptores activados por proliferadores peroxisomales (PPAR) son factores de transcripción activados por ligandos involucrados en múltiples procesos de diferenciación, desarrollo y regulación de la homeostasis lipídica (8). Se conocen tres subtipos: PPAR $\alpha$ , PPAR $\gamma$  y PPAR $\delta$ ; estos heterodimerizan con el receptor nuclear del ácido 9-cis-retinoico, formando complejos que interactúan con elementos de respuesta específicos en el ADN (9). La activación de estos receptores por sus ligandos específicos media el reclutamiento de factores coactivadores y la consecuente transcripción de genes de importancia en el control del metabolismo de lípidos y carbohidratos, la inflamación y el desarrollo (10,11). En efecto, en diferentes tejidos, agonistas de los PPAR regulan la transcripción de genes blanco vinculados con procesos de síntesis, oxidación y transporte de lípidos y ejercen transrepresión de factores de transcripción que estimulan procesos inflamatorios (8,11). Los agonistas endógenos de los PPAR son moléculas lipídicas (prostaglandinas y ácidos grasos poliinsaturados, entre otros). Sus agonistas farmacológicos (glitazonas y fibratos, entre otros) poseen claros efectos reguladores del metabolismo lipídico e hidrocarbonado y de la inflamación, y son utilizados en el tratamiento de la obesidad, las dislipidemias y la diabetes (12).

Modelos experimentales de diabetes y preñez han permitido identificar la capacidad de agonistas de PPAR de regular el metabolismo lipídico y procesos proinflamatorios durante la organogénesis temprana y en

el desarrollo fetal y placentario (13,14). Estudios realizados en la placenta humana identificaron a los PPAR como reguladores de la diferenciación e invasión trofoblástica y evidenciaron importantes alteraciones en la expresión de PPAR en la diabetes gestacional (15,16). En la diabetes pregestacional tipo 1, no se encontraron alteraciones en la expresión de PPAR $\gamma$ , aunque sí, menores niveles de su agonista endógeno, alteración vinculada a la anómala producción de óxido nítrico (17). No se sabe, sin embargo, si se encuentran alterados los niveles y función de PPAR en la placenta de pacientes con diabetes tipo 2.

Cobra relevancia el estudio de la diabetes tipo 2 en la gestación debido a la creciente y más temprana incidencia de este tipo de diabetes y al incremento en la edad materna que se evidencia en la actualidad. En forma similar a la diabetes tipo 1, la diabetes tipo 2 pregestacional incrementa el riesgo de malformaciones y abortos espontáneos (1,18). Además, la diabetes tipo 2 comparte con la diabetes gestacional y la diabetes tipo 1 el mayor riesgo de morbilidad y mortalidad perinatal, y la programación de enfermedades metabólicas y cardiovasculares en la vida adulta del neonato (5,19).

Sobre la base de los antecedentes descriptos, el objetivo del presente estudio fue evaluar los niveles de PPAR y la capacidad de los agonistas de PPAR de regular el metabolismo lipídico y la lipoperoxidación en la placenta a término de gestantes sanas y con diabetes tipo 2. ***Los resultados obtenidos han revelado una clara participación de los PPAR en la regulación del metabolismo lipídico y el entorno prooxidante en la placenta humana. Además, han permitido identificar importantes anomalías en el metabolismo lipídico, en los niveles de PPAR y un entorno prooxidante en la placenta de pacientes con diabetes tipo 2, alteraciones posiblemente vinculadas con las anomalías de crecimiento fetoplacentario y la programación intrauterina de enfermedades metabólicas en la diabetes materna.***

## Metodología

### Población

La población en estudio corresponde a pacientes de la Unidad II de Alto Riesgo de la Maternidad Ramón Sardá de Buenos Aires. Se incluyeron pacientes sanas (controles) y con diabetes tipo 2 (diagnosticadas mediante historia clínica y sin comorbilidades asociadas). En todos los casos, se excluyeron aquellas pacientes que presentaban alguna de las siguientes complicaciones: preeclampsia, trombofilia, complicaciones vasculares y/o renales, anemias con hemoglobina total  $\leq 8\%$ , nacimiento pretérmino ( $< 37$  semanas de gestación), rotura prematura de membranas, positividad de serologías de HIV, VDRL y hepatitis B, corioamnionitis, desprendimiento prematuro de placenta y sufrimiento fetal.

El protocolo fue aprobado por el Comité de Ética y Docencia del Hospital Materno-Infantil “Ramón Sardá”. De acuerdo con las normas institucionales, se obtuvo el consentimiento informado de las pacientes voluntarias.

#### *Preparaciones placentarias y diseño experimental*

Las placentas ( $n=12$  tanto en el grupo control como diabético) se obtuvieron a término mediante cesárea, llevada a cabo debido a razones obstétricas. Luego del alumbramiento, el tejido placentario fue inmediatamente trasladado al laboratorio para su procesamiento. Se separaron la placa basal y coriónica y se obtuvieron explantes de vellosidades coriónicas placentarias (100 mg); estos fueron inmediatamente congelados a  $-80^{\circ}\text{C}$  para posterior determinación de los niveles de PPAR $\alpha$ , PPAR $\gamma$  y PPAR $\delta$ , de lípidos neutros y polares y de la peroxidación lipídica. Se conservó el tejido en RNA later® para determinar la expresión génica de PPAR y de FASN (sintasa de ácidos grasos).

Por otro lado, las vellosidades placentarias (100 mg) fueron incubadas en baño metabólico bajo atmósfera de 5%  $\text{CO}_2$  en aire a  $37^{\circ}\text{C}$ , con y sin adiciones de agonistas de los tres isotipos de PPAR (PPAR $\alpha$ : LTB $_4$  1  $\mu\text{M}$ , clofibrato 20  $\mu\text{M}$ ; PPAR $\gamma$ : 15deoxydelta<sup>12,14</sup> PGJ $_2$  2  $\mu\text{M}$ ; rosiglitazona 3  $\mu\text{M}$ ; PPAR $\delta$ : carbaprostaciclina 1  $\mu\text{M}$ , GW501516 100 nM). Luego de tres horas de cultivo, el tejido se conservó a  $-80^{\circ}\text{C}$  para luego analizar los niveles de lípidos neutros y polares (triglicéridos, colesterol, ésteres de colesterol y fosfolípidos) y la lipotoxicidad placentaria (dosaje de TBARS).

#### *Materiales y métodos*

Niveles de PPAR: se evaluaron los niveles de PPAR $\alpha$ , PPAR $\gamma$  y PPAR $\delta$  mediante Western blot. Brevemente, cantidades equivalentes de proteínas en los extractos placentarios se sometieron a electroforesis vertical en gel SDS-PAGE, posteriormente se transfirieron a una membrana de nitrocelulosa y se realizó la inmunodetección con anticuerpos específicos (Cayman Co.) y revelados con un sistema y equipo especial de detección por quimioluminiscencia (ECL e ImageQuant, GE Healthcare). Como control interno se utilizaron anticuerpos antiactina. Se incluyó además un marcador de peso molecular comercial de detección por quimioluminiscencia (Magic Mark, Invitrogen). Las imágenes obtenidas se analizaron con el programa Image J.

Niveles de lípidos: se analizaron los niveles de triglicéridos, fosfolípidos, colesterol y ésteres de colesterol en tejido placentario mediante cromatografía en capa delgada y análisis densitométrico. Brevemente, los lípidos fueron extraídos y las distintas especies lipídicas separadas mediante cromatografía en capa delgada, donde se sembraron tanto las muestras como la curva es-

tándar que contenía cantidades conocidas de las distintas especies lipídicas por analizar. Las placas se desarrollaron en mezclas de solventes acordes con la separación de lípidos neutros y fosfolípidos, para luego revelar la ubicación de las especies lipídicas con vapores de yodo. Las imágenes fueron digitalizadas y analizadas mediante el programa de análisis de imágenes Sigmagel.

Expresión de PPAR y FASN: la expresión génica se estudió mediante RT-PCR. Brevemente, el ARN fue extraído de la placenta utilizando Trizol® y luego se realizó la transcripción reversa de los ARNm mediante cebadores específicos (Invitrogen) y la enzima M-MLV (Promega). A partir del ADNc obtenido se realizó la PCR que amplificó segmentos específicos de los genes de interés, y del gen de la proteína ribosomal humana RPL30 utilizada como control interno. La secuencia de cebadores para amplificar el ADNc fueron: 1) FASN: 5' CATCCAGATAGGCCTCATAGAC 3' (sentido) y 5' CTCCATGAAGTAGGAGTGGAAAG 3' (antisentido) (20); PPAR $\gamma$ : 5' CAGATCCAGTGGTTGCAG 3' (sentido) y 5' GTCAGCGGACTCTGGATT 3' (antisentido) (21); RPL30: 5' CCGCAAAGAAGACGAAAAAG 3' (sentido) y 5' AAAGCTGGGCAGTTGTTAGC 3' (antisentido), diseñados utilizando el programa PRIMER 3. Las condiciones de PCR fueron las siguientes para FASN, PPAR $\gamma$  o RPL30 respectivamente: un ciclo a  $95^{\circ}\text{C}$  por 5 min.; 36, 32 o 36 ciclos a  $95^{\circ}\text{C}$  por 30 seg.,  $56^{\circ}\text{C}$  por 30 seg.,  $72^{\circ}\text{C}$  por 30 seg. Los productos de reacción fueron separados por electroforesis en geles de 2% de agarosa con bromuro de etidio, se revelaron y digitalizaron bajo luz UV en equipo ImageQuant (GE Healthcare), y se utilizó el programa Image J para el análisis de la intensidad de las bandas.

Niveles de peroxidación lipídica: la peroxidación lipídica genera malondialdehído, que fue cuantificada mediante la reacción colorimétrica con ácido tiobarbitúrico (método de TBARS).

Estadística: los valores presentados fueron comparados empleando ANOVA (complementado con test paramétricos cuando corresponde) o el test  $t$  de Student, mediante el programa PRISMA de Graphpad. Las diferencias entre grupos se consideraron significativas cuando  $P$  fue menor o igual a 0,05.

#### **Resultados**

Las características del grupo de pacientes sanas (control) y pacientes con diabetes mellitus tipo 2 (DM2) en estudio se describen en la **Tabla I**. El grupo de pacientes diabéticas fue tratado con una dieta controlada de 1800 a 2000 Kcal diarias y con insulina (tratamiento personalizado). El monitoreo glucémico de estas pacientes demostró que este tratamiento logró mantener los niveles de glucemia en ayunas entre los parámetros normales. Sin embargo,

este grupo de pacientes diabéticas mostró un incremento en el peso placentario y neonatal con respecto al control. Con respecto a las complicaciones en los neonatos de madre diabética, 1 de 12 casos presentó síndrome de distrés respiratorio y 2 de 12 casos presentaron macrosomía.

Los datos representan el promedio  $\pm$  S.E.M. Test estadístico: t-Student.

<sup>a</sup>Primer trimestre de gestación, <sup>b</sup>Tercer trimestre de gestación, <sup>c</sup>Parto.

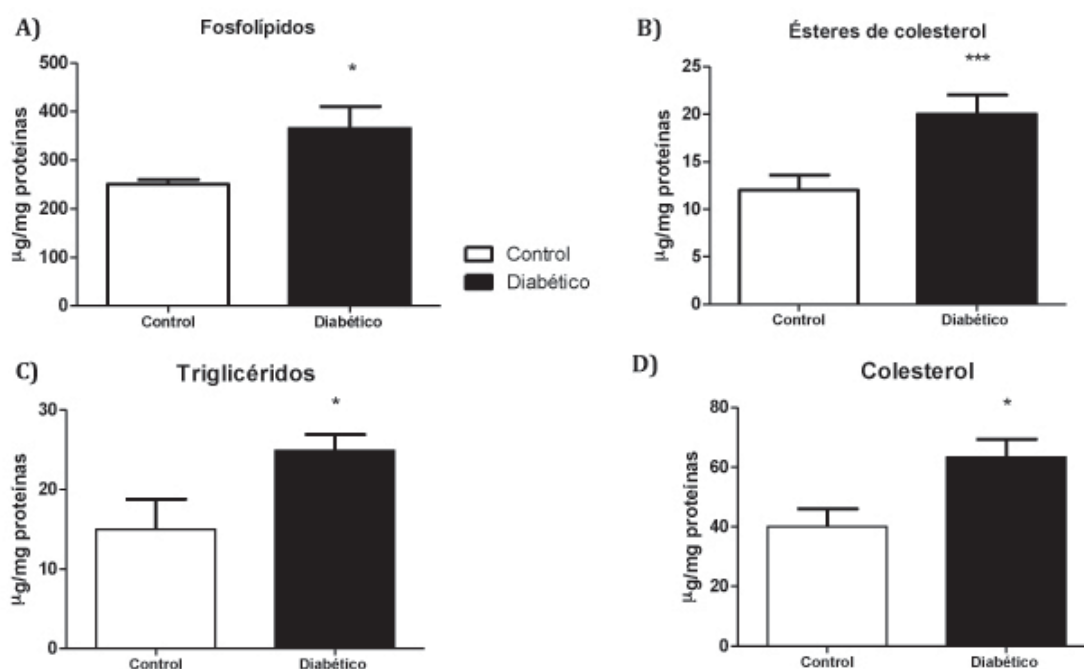
Abreviaturas: IMC: índice de masa corporal; DM2: diabetes mellitus tipo 2; SDR: síndrome de distrés

respiratorio. \* $P<0,05$ , \*\*\* $P<0,001$  versus pacientes sanas (control).

Conociendo la relevancia de la placenta como órgano que media y regula la transferencia, acumulación y transporte de lípidos fetoplacentario, se estudiaron los niveles de lípidos en las placentas a término de pacientes sanas y diabéticas. Se observó un incremento en los niveles de fosfolípidos ( $p<0,05$ , **Figura 1.A**), ésteres de colesterol ( $P<0,001$ ; **Figura 1.B**), triglicéridos ( $P<0,05$ ; **Figura 1.C**) y colesterol ( $P<0,05$ ; **Figura 1.D**) en las placentas de pacientes diabéticas comparadas con las placentas de pacientes sanas.

**Tabla I. Datos antropométricos y metabólicos de la población en estudio.**

	Pacientes control (n=12)	Pacientes DM2 (n=12)
<b>Edad materna (años)</b>	27,7 $\pm$ 1,7	32,4 $\pm$ 1,7
<b>Paridad</b>		
Primíparas	1	1
Multíparas	11 (paridad: 2 a 6)	11 (paridad: 2 a 7)
<b>Glucemia en ayunas (mg/dl)<sup>a,b</sup></b>	<99	75-100
<b>IMC materno (kg/m<sup>2</sup>)<sup>a</sup></b>	26 $\pm$ 1,8	29 $\pm$ 1,6
<b>Tratamientos<sup>b</sup></b>		
Dieta (Kcal)	—	1800-2000
Insulina (U por día)	—	24-138
<b>Edad gestacional (semanas)<sup>c</sup></b>	38,5 $\pm$ 0,2	38,6 $\pm$ 0,3
<b>Peso placentario (g)<sup>c</sup></b>	508 $\pm$ 12	581 $\pm$ 28 *
<b>Peso fetal (g)<sup>c</sup></b>	3217 $\pm$ 96	3795 $\pm$ 113 ***
<b>Complicaciones neonatales<sup>c</sup></b>	Ninguna	SDR (n=1) Macrosomía (n=2)



**Figura 1. Niveles de lípidos en placentas de pacientes sanas (control) y pacientes diabéticas.** Los lípidos evaluados son (A) fosfolípidos; (B) ésteres de colesterol; (C) triglicéridos y (D) colesterol. Los datos representan la media  $\pm$  S.E.M. n=12. Test estadístico: t-Student. \*  $P<0,05$ ; \*\*\*  $P<0,001$  vs. control.

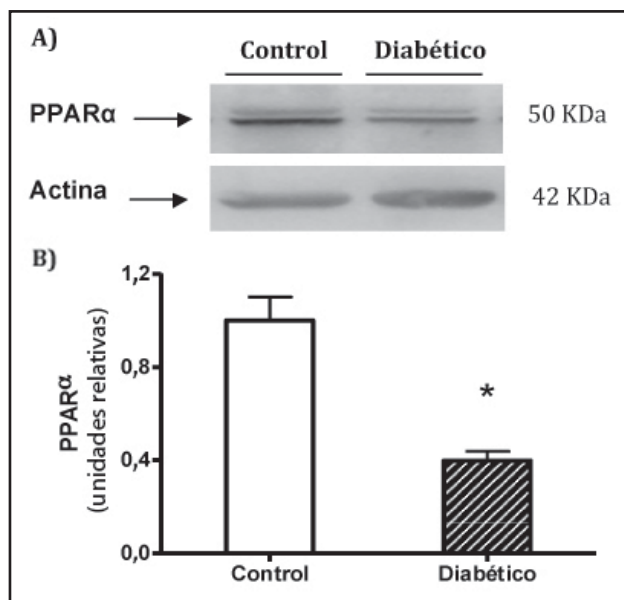


Dado que los PPAR son importantes reguladores del metabolismo lipídico en diferentes tejidos, nuestro principal objetivo ha sido estudiar la posible vinculación entre las alteraciones encontradas en los niveles de lípidos placentarios, con posibles alteraciones en los niveles de PPAR, como así también evaluar los efectos regulatorios de sus agonistas endógenos y farmacológicos en la regulación de los niveles lipídicos. Se analizaron los tres isotipos de este receptor: PPAR $\alpha$ , PPAR $\delta$  y PPAR $\gamma$ .

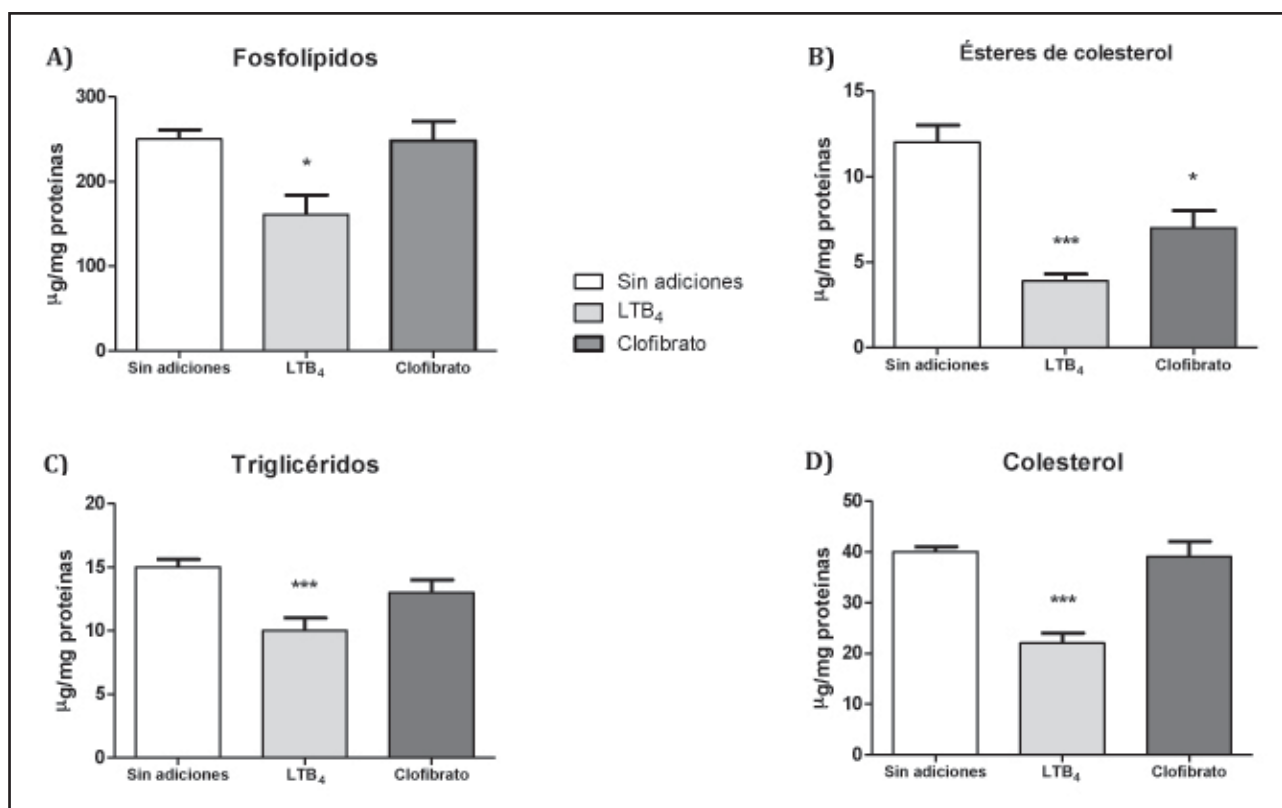
Al evaluar las concentraciones placentarias de PPAR $\alpha$ , pudimos observar que sus niveles se encuentran reducidos en el tejido placentario de pacientes con diabetes en relación con el control (**Figura 2**).

Al estudiar el efecto de agonistas de PPAR $\alpha$  sobre las concentraciones lipídicas en placentas de pacientes sanas, observamos que LTB $_4$ , su agonista endógeno, fue capaz de reducir los niveles de todos los lípidos analizados ( $P < 0,05$ ; **Figura 3**), mientras que el agonista farmacológico, clofibrato, redujo los niveles de ésteres de colesterol ( $P < 0,05$ ; **Figura 3.B**).

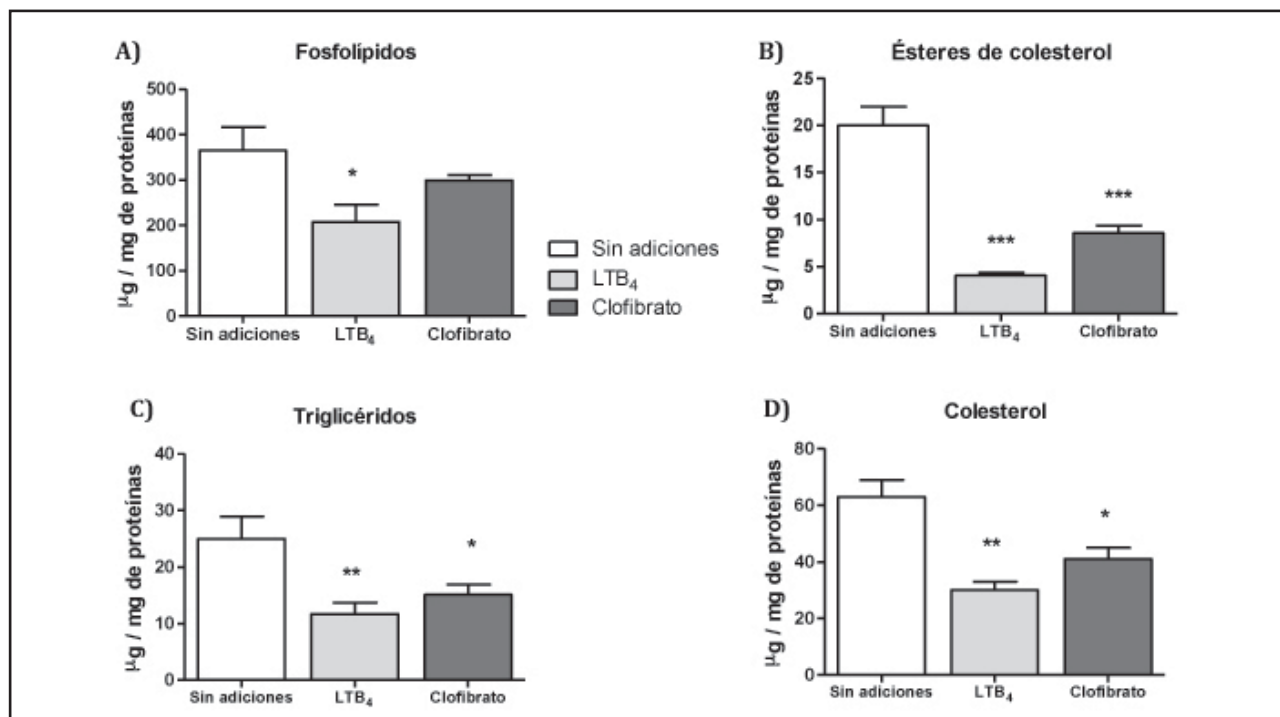
Al evaluar el efecto de la activación de PPAR $\alpha$  en la placenta de pacientes diabéticas observamos que LTB $_4$  redujo significativamente las concentraciones de todos los lípidos evaluados ( $P < 0,05$ ; **Figura 4**), mientras



**Figura 2. Niveles de PPAR $\alpha$ .** A) Western blot representativo de los niveles de PPAR $\alpha$  en placentas de pacientes sanas (control) y con diabetes. B) Análisis densitométrico de los niveles de PPAR $\alpha$  en placentas de mujeres sanas (control) y con diabetes. Los datos representan la media  $\pm$  S.E.M. n=8. Test estadístico: t-Student. \*  $P < 0,05$  vs. control.



**Figura 3. Concentraciones de lípidos en explantes placentarios de pacientes sanas, cultivados sin adiciones o en presencia de LTB $_4$  (1  $\mu$ M) o clofibrato (20  $\mu$ M).** Los lípidos evaluados son (A) fosfolípidos; (B) ésteres de colesterol; (C) triglicéridos y (D) colesterol. Los datos representan la media  $\pm$  S.E.M. n=12. Test estadístico: ANOVA. \*  $P < 0,05$ ; \*\*\*  $P < 0,001$  vs. sin adiciones.



**Figura 4. Concentraciones de lípidos en explantes placentarios de pacientes diabéticas, cultivados sin adiciones o en presencia de LTB<sub>4</sub> (1 µM) o clofibrato (20 µM).** Los lípidos evaluados son (A) fosfolípidos; (B) ésteres de colesterol; (C) triglicéridos y (D) colesterol. Los datos representan la media ± S.E.M. n=12. Test estadístico: ANOVA. \*  $P<0,05$ ; \*\*  $P<0,01$  vs. sin adiciones.

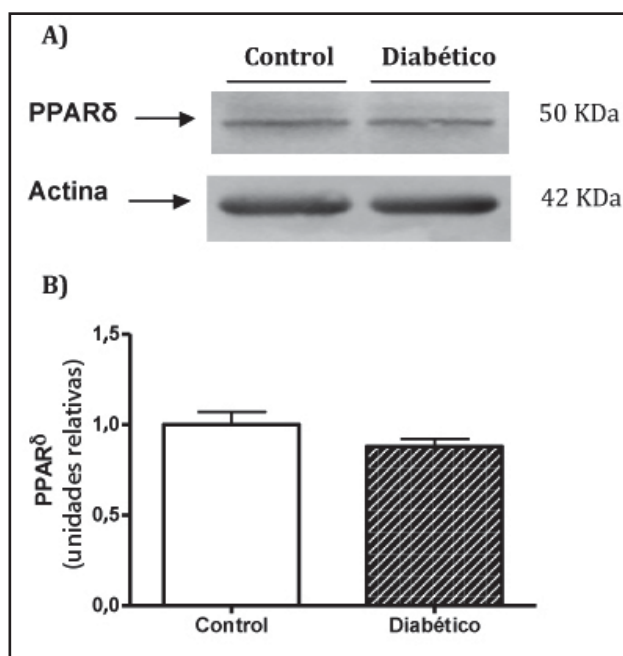
que el clofibrato redujo los niveles de ésteres de colesterol, triglicéridos y colesterol ( $P<0,05$ ; **Figura 4.B-D**).

De esta forma, se evidenció la capacidad reguladora de PPAR $\alpha$  sobre la masa lipídica placentaria, evidente tanto en las placentas de pacientes sanas como de pacientes diabéticas, sugiriéndose que los menores niveles de este receptor nuclear identificados en las placentas de pacientes diabéticas estarían involucrados en la mayor acumulación de diferentes especies de lípidos placentarios.

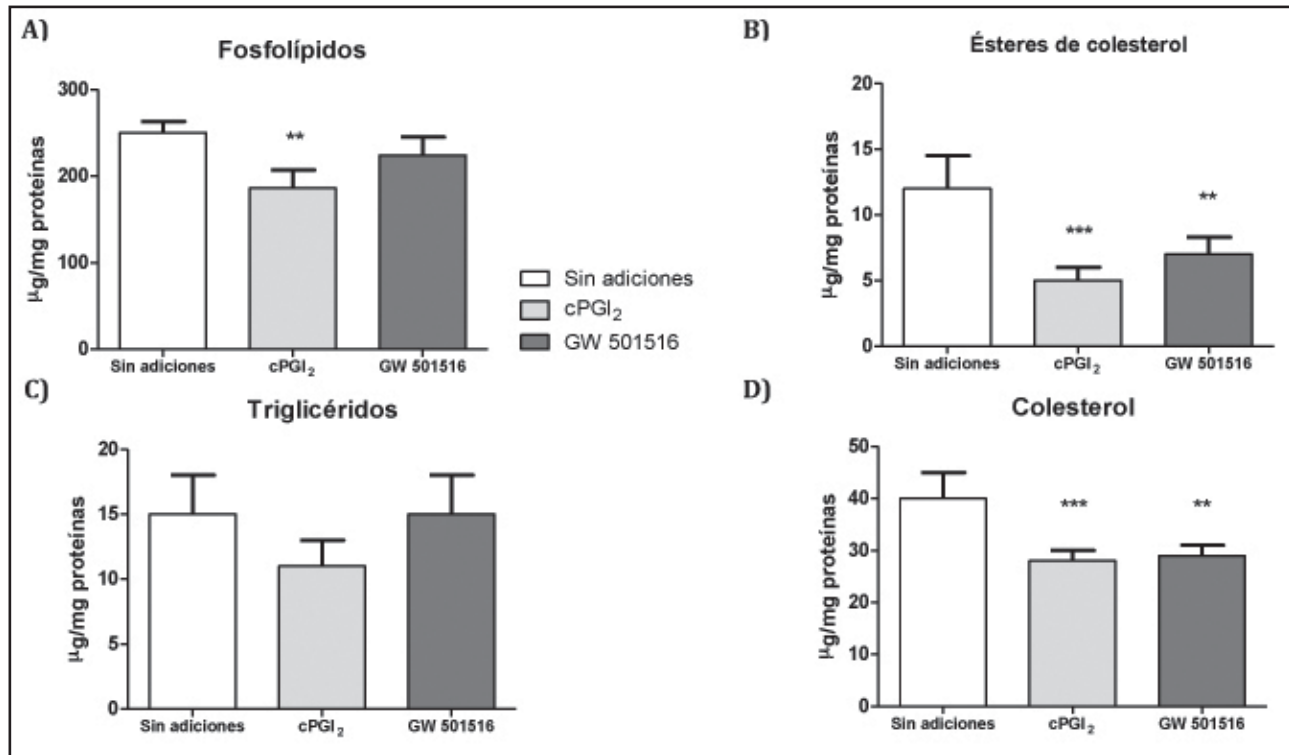
Se continuó el estudio con el análisis de PPAR $\delta$ . Al evaluar sus niveles, pudimos observar que los mismos no se modifican en el tejido placentario de pacientes con diabetes en relación al control (**Figura 5**).

Al estudiar el efecto de agonistas de PPAR $\delta$  sobre las concentraciones lipídicas en placentas de pacientes sanas, observamos que la carbaprostaciclina (cPGI<sub>2</sub>), análogo de PGI<sub>2</sub> y activador de PPAR $\delta$ , fue capaz de reducir los niveles de fosfolípidos ( $P<0,01$ ; **Figura 6.A**), ésteres de colesterol ( $P<0,001$ ; **Figura 6.B**) y colesterol ( $P<0,001$ ; **Figura 6.D**), mientras que GW 501516, agonista farmacológico de PPAR $\delta$  redujo los niveles de ésteres de colesterol ( $P<0,01$ ; **Figura 6.B**) y colesterol ( $P<0,01$ ; **Figura 6.D**).

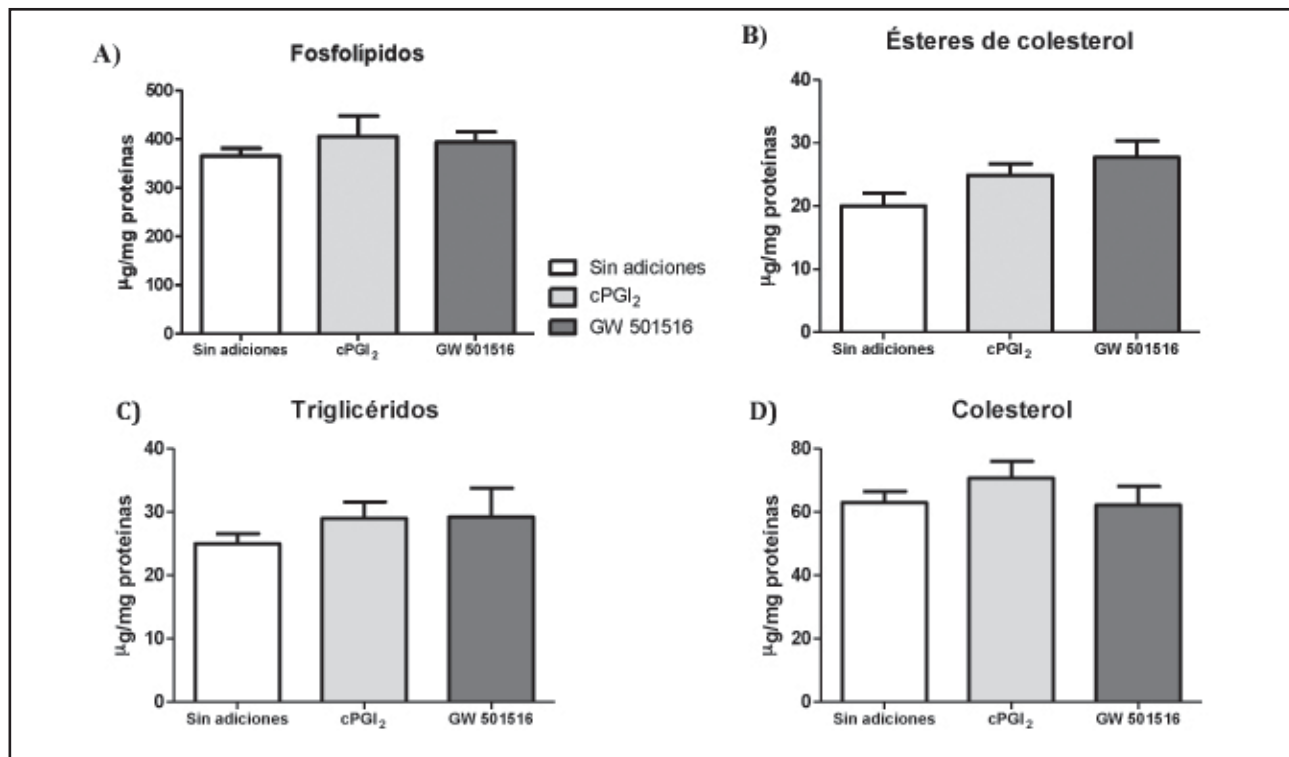
En forma diferente, al estudiar el efecto de la activación de PPAR $\delta$  en la placenta de pacientes diabéticas, observamos que cPGI<sub>2</sub> y GW501516 no fueron capaces de modificar los niveles de ninguna de las especies lipídicas estudiadas (**Figura 7**).



**Figura 5. Niveles de PPAR $\delta$ .** A) Western blot representativo de los niveles de PPAR $\delta$  en placentas de mujeres sanas y con diabetes. B) Análisis densitométrico de los niveles de PPAR $\delta$  en placentas de mujeres sanas (control) y con diabetes. Los datos representan la media ± S.E.M. n=8. Test estadístico: t-Student.



**Figura 6. Concentraciones de lípidos en explantes placentarios de pacientes sanas, cultivados sin adiciones o en presencia de cPGI<sub>2</sub> (1 µM) o de GW 501516 (100 nM).** Los lípidos evaluados son (A) fosfolípidos; (B) ésteres de colesterol; (C) triglicéridos y (D) colesterol. Los datos representan la media ± S.E.M. n=12. Test estadístico: ANOVA. \*\*P<0,01; \*\*\*P<0,001 vs. sin adiciones.

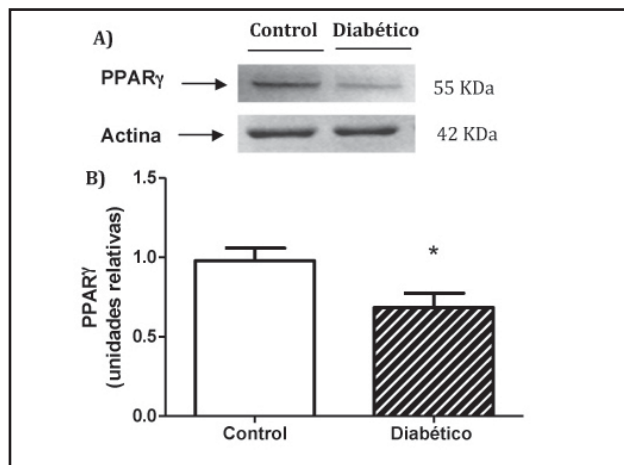


**Figura 7. Concentraciones de lípidos en explantes placentarios de pacientes diabéticas, cultivados sin adiciones o en presencia de cPGI<sub>2</sub> (1 µM) o de GW 501516 (100 nM).** Los lípidos evaluados son (A) fosfolípidos; (B) ésteres de colesterol; (C) triglicéridos y (D) colesterol. Los datos representan la media ± S.E.M. n=12. Test estadístico: t-Student.

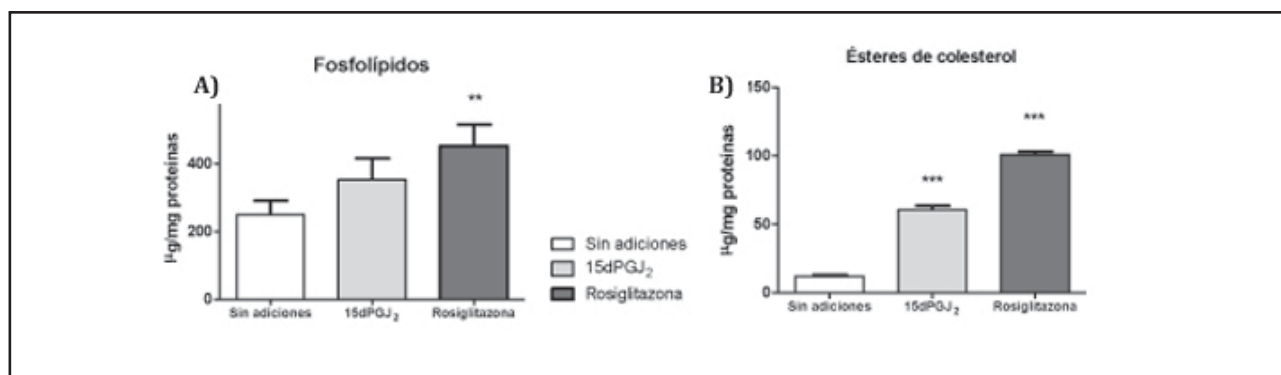
De esta forma, el estudio de PPAR $\delta$  no demuestra alteraciones en sus niveles en la placenta de pacientes diabéticas, sin embargo, los efectos lipolíticos evidentes cuando dicho receptor nuclear se activa en la placenta de pacientes sanas, no se evidencian en la placenta de pacientes diabéticas, alteración funcional que podría estar involucrada en el mayor contenido lipídico presente en la placenta de pacientes con diabetes.

Se continuó el estudio con el análisis de PPAR $\gamma$  en la placenta a término. El estudio de sus niveles reveló que en placentas de pacientes con diabetes sus niveles están disminuidos con respecto a los encontrados en placentas control (Figura 8).

Al estudiar el efecto de agonistas de PPAR $\gamma$  sobre las concentraciones lipídicas en placentas de pacientes sanas, observamos que 15dPGJ $_2$ , agonista endógeno de PPAR $\gamma$ , aumenta los niveles de ésteres de colesterol, triglicéridos y colesterol ( $P<0,01$ ; Figura 9.B-E), mientras que la rosiglitazona, agonista farmacológico de



**Figura 8. Niveles de PPAR $\gamma$ .** A) Western blot representativo de los niveles de PPAR $\gamma$  en placentas de mujeres sanas y con diabetes. B) Análisis densitométrico de los niveles de PPAR $\gamma$  en placentas de mujeres sanas (control) y con diabetes. Los datos representan la media  $\pm$  S.E.M. n=8. Test estadístico: t-Student. \* $P<0,05$  vs. control.



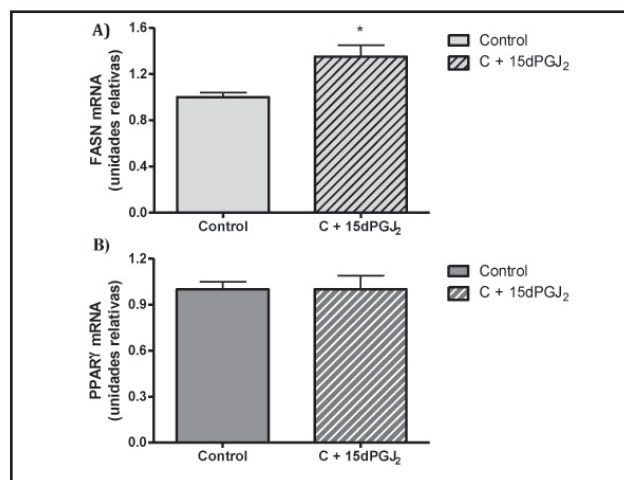
**Figura 9. Concentraciones de lípidos en explantes placentarios de pacientes sanas, cultivados sin adiciones o en presencia de 15dPGJ $_2$  (2  $\mu$ M) o de rosiglitazona (3  $\mu$ M).** Los lípidos evaluados son (A) fosfolípidos; (B) ésteres de colesterol; (C) triglicéridos y (D) colesterol. Los datos representan la media  $\pm$  S.E.M. n=12. Test estadístico: ANOVA. \*\* $P<0,01$ ; \*\*\* $P<0,001$  vs. sin adiciones.

PPAR $\gamma$ , aumentó los niveles de todos los lípidos evaluados ( $P<0,01$ ; Figura 9).

Dada la capacidad de los agonistas de PPAR $\gamma$  de incrementar los niveles de lípidos neutros y polares en la placenta humana, evaluamos el efecto de su agonista endógeno 15dPGJ $_2$  sobre la expresión de la enzima sintasa de ácidos grasos FASN que, como su nombre lo indica, participa en el proceso de lipogénesis y también su efecto sobre el propio receptor nuclear PPAR $\gamma$ .

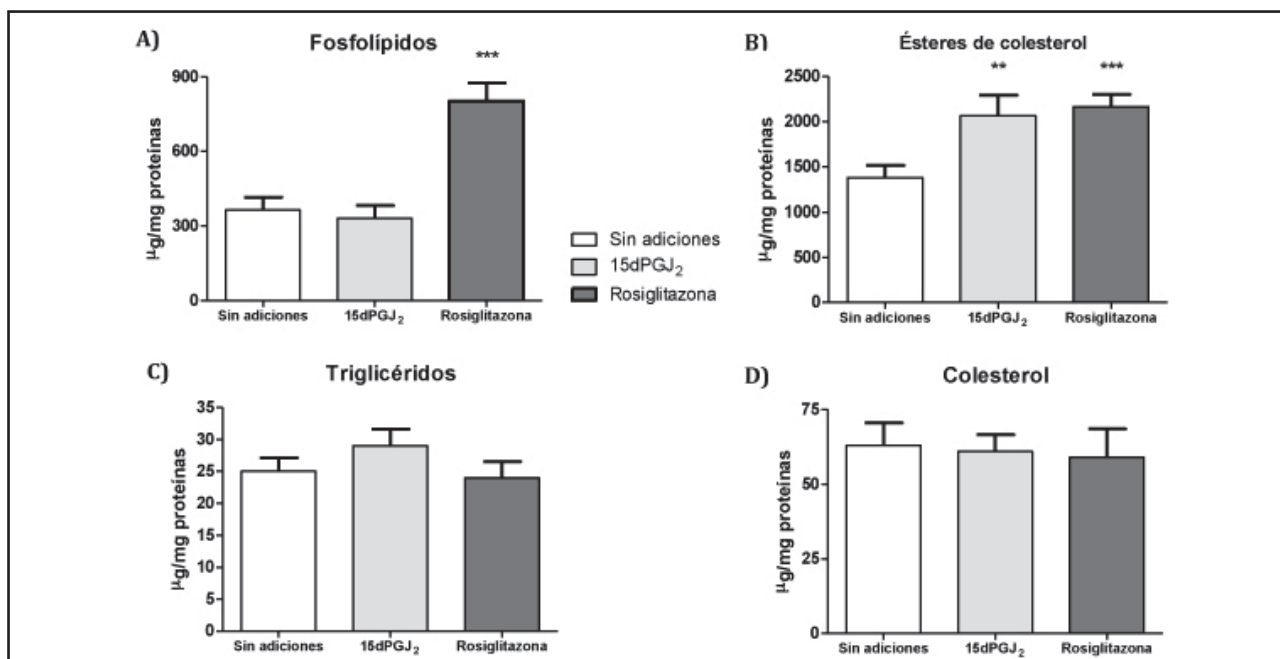
Observamos que en placentas de pacientes sanas la expresión de FASN se incrementa al activar PPAR $\gamma$  ( $P<0,05$ , Figura 10.A), mientras que no se modifica la expresión del propio receptor PPAR $\gamma$  al activar este receptor nuclear (Figura 10.B).

Por otro lado, al evaluar la placenta de pacientes diabéticas, observamos que las adiciones de 15dPGJ $_2$ , agonista endógeno de PPAR $\gamma$ , aumenta los niveles de ésteres de colesterol ( $P<0,05$ ; Figura 11.B) y rosiglitazona,



**Figura 10. Expresión de (A) FASN y (B) PPAR $\gamma$  en explantes placentarios de pacientes sanas, cultivados sin adiciones o en presencia de 15dPGJ $_2$  (2  $\mu$ M).** Los datos representan la media  $\pm$  S.E.M. n=8. Test estadístico: t-Student. \* $P<0,05$  vs. sin adiciones.





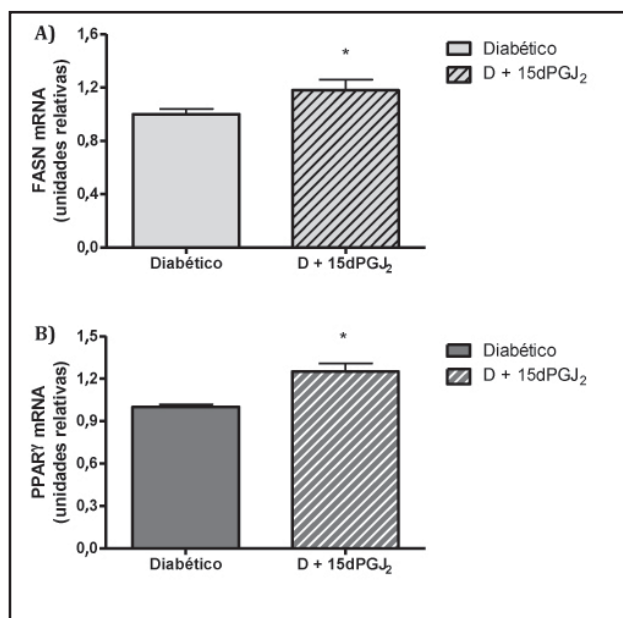
**Figura 11. Concentraciones de lípidos en explantes placentarios de pacientes diabéticas, cultivados sin adiciones o en presencia de 15dPGJ<sub>2</sub> (2 µM) o rosiglitazona (3 µM).** Los lípidos evaluados son (A) fosfolípidos; (B) ésteres de colesterol; (C) triglicéridos y (D) colesterol. Los datos representan la media ± S.E.M. n=12. Test estadístico: ANOVA. \*\* P<0,01; \*\*\* P<0,001 vs. sin adiciones.

agonista farmacológico de dicho receptor, incrementa los niveles de fosfolípidos y ésteres de colesterol ( $P<0,01$ ; **Figura 11.A-B**).

Considerando la capacidad de los agonistas de PPAR $\gamma$  de incrementar los niveles de lípidos en las placentas de pacientes diabéticas, estudiamos el efecto de su agonista endógeno 15dPGJ<sub>2</sub> tanto sobre la expresión de la enzima sintasa de ácidos grasos FASN como sobre la expresión del receptor nuclear PPAR $\gamma$ . Observamos que el agonista PPAR $\gamma$  estimuló la expresión de FASN en placentas de pacientes diabéticas ( $P<0,05$ , **Figura 12.A**). Además, a diferencia de lo observado en placentas de pacientes sanas (control), 15dPGJ<sub>2</sub> incrementó la expresión de PPAR $\gamma$  en la placenta de las pacientes con diabetes ( $P<0,05$ , **Figura 12.B**).

De esta forma, el estudio de PPAR $\gamma$  nos muestra los menores niveles de este isotipo de PPAR, y su capacidad de regular mecanismos vinculados a la acreción de lípidos placentarios, de relevancia para su función regulatoria de la cantidad y clase de lípidos que se transfieren al feto en desarrollo.

Por último, considerando la sobreacumulación lipídica observada y el conocido estado prooxidante que puede inducir la diabetes en la gestación (22,23), se evaluó la presencia de peroxidación lipídica en la placenta de pacientes con diabetes tipo 2, como así también la posible acción de agonistas de PPAR sobre la formación de lipoperoxidos, marcadores de estrés oxidativo e indicadores de daño a lípidos bioactivos y con función estructural.



**12. Expresión de (A) FASN y (B) PPAR $\gamma$  en explantes placentarios de pacientes diabéticas, cultivados sin adiciones o en presencia de 15dPGJ<sub>2</sub> (2 µM).** Los datos representan la media ± S.E.M. n=8. Test estadístico: t-Student. \* P<0,05 vs. sin adiciones.

La peroxidación lipídica ha sido evaluada cuantificando las especies reactivas al ácido tiobarbitúrico (TBARS). Se observó que los niveles de TBARS se encuentran incrementados al compararlos con el tejido control ( $P<0,001$ ; **Figura 13**).

Para analizar la posible acción de agonistas de PPAR en la regulación de la formación de lipoperóxidos, los explantes placentarios de pacientes sanas y pacientes con diabetes fueron cultivados en presencia o ausencia de  $\text{LTB}_4$  (1  $\mu\text{M}$ ) o clofibrato (20  $\mu\text{M}$ ), agonistas de  $\text{PPAR}\alpha$ ;  $\text{PGI}_2$  (1  $\mu\text{M}$ ) o GW 501516 (100 nM), agonistas de  $\text{PPAR}\delta$ ; y 15dPGJ<sub>2</sub> (2  $\mu\text{M}$ ) o rosiglitazona (3  $\mu\text{M}$ ) agonistas de  $\text{PPAR}\gamma$ .

Al estudiar los efectos de agonistas de  $\text{PPAR}\alpha$  sobre los niveles de lipoperóxidos observamos que su agonista endógeno  $\text{LTB}_4$ , no modificó los niveles de lipoperóxidos en placentas de pacientes controles (**Figura 14.A**), pero fue capaz de reducir dichos niveles en placentas de pacientes con diabetes ( $P<0,05$ ; **Figura 14.B**). El clofibrato, agonista farmacológico de  $\text{PPAR}\alpha$ , no fue capaz de modificar los niveles de lipoperóxidos en ninguno de los dos grupos (**Figura 14**).

El estudio del efecto de agonistas de  $\text{PPAR}\delta$  reveló que tanto su agonista endógeno, la  $\text{cPGI}_2$ , como su agonista farmacológico, el GW 501516 fueron capaces de reducir los niveles de lipoperóxidos en placentas de pacientes sanas ( $P<0,01$ ; **Figura 15.A**). En cambio, en placentas de pacientes con diabetes, sólo la  $\text{cPGI}_2$  fue capaz de reducir los niveles de lipoperóxidos ( $P<0,05$ ; **Figura 15.B**).

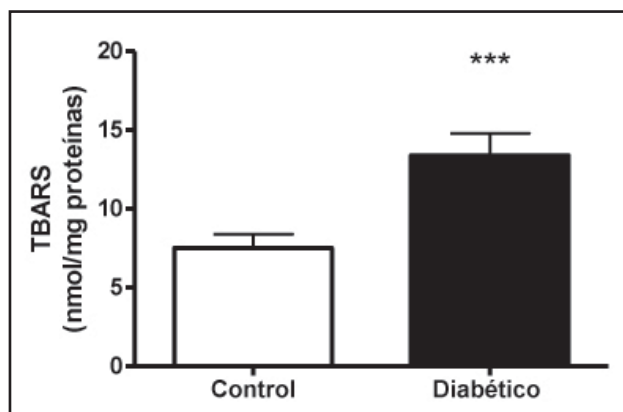
La adición de 15dPGJ<sub>2</sub> redujo los niveles de TBARS en placentas de pacientes sanas ( $P<0,01$ ; **Figura 16.A**) y diabéticas ( $P<0,05$ ; **Figura 16.B**). La adición del agonista farmacológico de  $\text{PPAR}\gamma$ , rosiglitazona, sólo fue capaz de disminuir los niveles de TBARS en placentas de pacientes diabéticas ( $P<0,01$ ; **Figura 16.B**).

*Sobre la base de estos resultados, es importante destacar que en placentas de pacientes diabéticas la deficiencia en los niveles de  $\text{PPAR}\alpha$  y  $\text{PPAR}\gamma$  podría contribuir a la inducción del estado prooxidante que se pone de manifiesto en esta patología.*

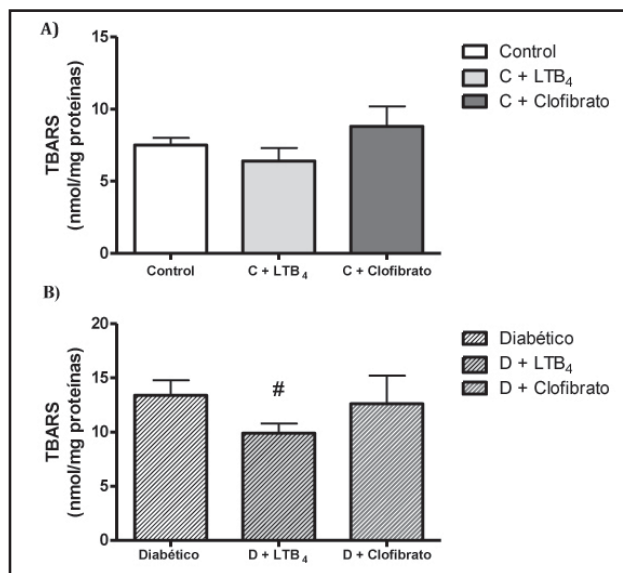
## Discusión

Los resultados obtenidos han permitido identificar alteraciones del metabolismo lipídico y en la lipoperoxidación en la placenta de gestantes con diabetes tipo 2. Además, permitieron establecer la relevancia del sistema PPAR como regulador de procesos metabólicos y prooxidantes en la placenta humana, y determinar que las alteraciones en este sistema podrían vincularse con fallas de regulación metabólica en la placenta de pacientes con diabetes tipo 2.

Si bien estudios previos han caracterizado el estado proinflamatorio en la placenta de gestantes con diabetes tipo 1 y gestacional (22), poco se conoce de la DM2 en la gestación, patología cuya prevalencia aumenta día a día, debido a su aparición en edades más tempranas y al aumento de la edad en la cual las mujeres planean un embarazo.

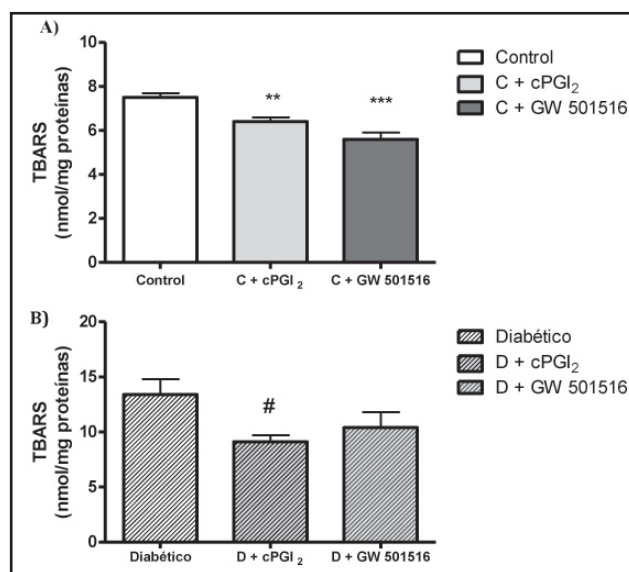


**Figura 13. Niveles de TBARS en placentas de pacientes sanas y pacientes diabéticas a término.** Los datos representan la media  $\pm$  S.E.M.  $n=12$ . Test estadístico: t-Student. \*\*\* $P<0,001$  vs. control.

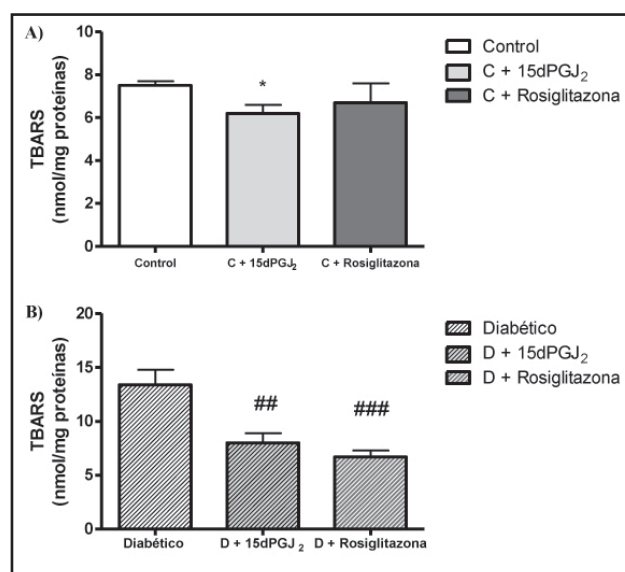


**Figura 14. Efecto de  $\text{LTB}_4$  (1  $\mu\text{M}$ ) y clofibrato (20  $\mu\text{M}$ ), agonistas de  $\text{PPAR}\alpha$ , sobre los niveles de lipoperóxidos en placentas a término de (A) pacientes sanas (control) y (B) pacientes diabéticas.** Los datos representan la media  $\pm$  S.E.M.  $n=12$ . Test estadístico: ANOVA. #  $P<0,05$  vs. diabéticas.

Los resultados indican que acompañando al incremento de peso placentario y fetal, se evidencia en las placentas de mujeres con diabetes tipo 2, una mayor acumulación lipídica, acompañada de una mayor lipoperoxidación (indicando estrés oxidativo). Estas alteraciones posiblemente estén vinculadas con el incremento en el peso tanto placentario como fetal, ya que la placenta es el órgano donde se regula el transporte de nutrientes hacia el feto, y tanto la sobreacumulación de lípidos como el anómalo entorno generado por las mayores concentraciones de especies reactivas de oxígeno, podrán condicionar un estado donde a la mayor concentración de



**FIGURA 15. Efecto de cPGI<sub>2</sub> (1µM) y GW 501516 (100nM), agonistas de PPAR<sub>δ</sub>, sobre los niveles de lipoperoxidos en placentas a término de (A) pacientes sanas (control) y (B) pacientes diabéticas.** Los datos representan la media ± S.E.M. n=12. \*\*p<0,01, \*\*\*p<0,001 vs. control; Test estadístico: ANOVA. # P<0,05 vs. diabéticas.



**Figura 16. Efecto de 15dPGJ<sub>2</sub> (2 µM) y rosiglitazona (3 µM), agonistas de PPAR<sub>γ</sub>, sobre los niveles de lipoperoxidos en placentas a término de (A) pacientes sanas (control), y (B) pacientes diabéticas.** Los datos representan la media ± S.E.M. n=12. Test estadístico: ANOVA. \*P<0,05 vs. control; ##P<0,01, ###P<0,001 vs. diabéticas.

sustratos derivados de circulación materna, se suma la falta de control adecuado a nivel placentario de los nutrientes a ser transferidos al feto en desarrollo.

Se han demostrado fallas en los sistemas regulatorios, posiblemente evidentes en diferentes vías de señalización vinculadas al crecimiento y desarrollo feto-placentario, en este estudio en el análisis de los niveles y función de los receptores nucleares PPAR. Estos factores de transcripción activados por ligandos, claramente relevantes en procesos de diferenciación celular, homeostasis lipídica y desarrollo (8,24), han mostrado en este estudio ser importantes reguladores de la masa lipídica placentaria y la lipoperoxidación en la placenta humana a término.

Estudios previos habían identificado anomalías en la expresión de PPAR<sub>α</sub> y PPAR<sub>γ</sub>, sin evidenciar fallas en la expresión de PPAR<sub>δ</sub>, en la placenta de pacientes con diabetes gestacional (25,26). En forma diferente, no se evidencian alteraciones en los niveles de PPAR<sub>γ</sub> en la placenta de pacientes con diabetes tipo 1 (25). Este estudio revela que en forma semejante a lo observado en la placenta con diabetes gestacional, existen anomalías en la expresión de PPAR<sub>α</sub> y PPAR<sub>γ</sub>, y no en la expresión de PPAR<sub>δ</sub> en la placenta a término de pacientes con diabetes tipo 2.

Resultados interesantes surgen del análisis de la funcionalidad de los tres isotipos de PPAR.

Observamos que PPAR<sub>α</sub> regula en la placenta humana a término los niveles de diferentes especies

lipídicas, y que su acción es diferencial al utilizar activadores endógenos y farmacológicos, tal como se ha demostrado en diferentes estudios previos en diferentes tejidos (11). Su activación es efectiva y capaz de regular en la placenta de pacientes con diabetes la masa lipídica y la peroxidación lipídica. Estos hallazgos nos indican que tal como fue previamente observado en modelos experimentales de diabetes, su activación podría ser eficaz en la regulación de alteraciones placentarias inducidas por la diabetes materna, y quizás, tal como se estudió en modelos animales, podría ejercer efectos benéficos a nivel fetal (14,27,28). *Se destaca de esta forma que la activación de PPAR<sub>α</sub> es relevante en la regulación de anomalías del metabolismo lipídico y del entorno prooxidante en la placenta de pacientes con diabetes tipo 2, y que los niveles endógenos de este receptor nuclear se encuentran reducidos en la diabetes materna.*

A diferencia de lo observado para PPAR<sub>α</sub>, el isotipo PPAR<sub>δ</sub> no presenta anomalías en su expresión en el tejido placentario de pacientes con diabetes tipo 2 en relación con el control, sin embargo, los estudios efectuados evidencian que la regulación de tipo catabólica de los niveles de lípidos placentarios no se efectúa en el tejido diabético tal como ocurre en el tejido de pacientes sanos, alteración que podría contribuir a la mayor masa lipídica en el tejido diabético. Además, la activación de este isotipo del receptor conduce a la reducción de la peroxidación lipídica tanto en el tejido sano como en el proveniente de pacientes diabéticos. *De esta forma, si*

bien la activación de PPAR $\delta$  no tendría efectos regulatorios del metabolismo lipídico placentario cuando el tejido proviene de pacientes con diabetes tipo 2, se evidencia en la placenta de las gestantes diabéticas estudiadas efectos benéficos vinculados a la reducción de la peroxidación lipídica, posiblemente relevantes para el desarrollo y la función del tejido placentario.

Por último, en este estudio hemos encontrado que la activación de PPAR $\gamma$  en las placentas de pacientes diabéticas incrementa la masa lipídica placentaria. Este efecto había sido previamente observado en la placenta de animales sanos y diabéticos, y en trofoblastos aislados de placentas humanas sanas a término (14,29). Este efecto podría estar vinculado a la acción de agonistas de PPAR sobre la expresión de FASN, enzima de síntesis de ácidos grasos. Se destaca que se evidenció un incremento en la expresión de PPAR $\gamma$  en la placenta de pacientes diabéticas en presencia de agonistas de este receptor nuclear, lo que nos marca la capacidad de retroalimentación positiva de estos agonistas, de relevancia ante la reducción de este receptor nuclear evidenciado en la placenta de mujeres con diabetes.

En cuanto a marcadores de estrés oxidativo, observamos que la peroxidación lipídica se encuentra negativamente regulada por la activación de PPAR $\gamma$  tanto en la placenta de mujeres sanas como en aquellas provenientes de mujeres con diabetes tipo 2. Nuevamente, este efecto es relevante ya que mejoraría la funcionalidad placentaria y, en consecuencia, la clase y tipo de nutrientes transferidos y las moléculas señal producidas, involucrados en el crecimiento y desarrollo del feto. *De esta forma, la activación de PPAR $\gamma$  sería relevante mayormente por su capacidad de regular negativamente la sobreproducción de especies reactivas de oxígeno en la placenta de mujeres con diabetes tipo 2, y sus menores niveles podrían estar vinculados a las anomalías de tipo prooxidantes evidentes en el tejido placentario en esta patología.*

## Conclusiones

*Los hallazgos de este estudio demuestran importantes anomalías en el metabolismo de lípidos y la presencia de un estado prooxidante en la placenta de pacientes con diabetes tipo 2, anomalías que se acompañan de diferentes alteraciones en la expresión y función de los receptores nucleares PPAR, particulares para cada isotipo, y que condicionarían la función placentaria y, en consecuencia, el desarrollo fetal. La importante función metabólica y reguladora de parámetros prooxidantes ejercidas por los agonistas de PPAR que ha sido identificada en la placenta humana a término de pacientes sanas y diabéticas nos brinda un aporte básico necesario para comprender mecanismos reguladores del anómalo entorno metabólico y proinflamatorio que induce*

*la diabetes tipo 2 materna en forma intrauterina, base para el diseño de estrategias terapéuticas necesarias para prevenir estas anomalías y sus adversas consecuencias en la vida del neonato.*

## Referencias

1. Michael Weindling A. Offspring of diabetic pregnancy: short-term outcomes. *Semin Fetal Neonatal Med.* 2009;14(2):111-8.
2. Persson B, Eriksson U, Hanson U. Offspring of Diabetic Pregnancy. En: Djelmis J, Desoye G, Ivanisevic M, eds. *Diabetology of Pregnancy.* Basel: Karger; 2005. pp. 288-309.
3. Jansson T, Cetin I, Powell TL, Desoye G, Radaelli T, Ericsson A, et al. Placental transport and metabolism in fetal overgrowth -- a workshop report. *Placenta.* 2006;27(Suppl A):S109-13.
4. Aerts L, Van Assche FA. Intra-uterine transmission of disease. *Placenta.* 2003;24(10):905-11.
5. Plagemann A, Harder T, Dudenhausen JW. The diabetic pregnancy, macrosomia, and perinatal nutritional programming. *Nestle Nutr Workshop Ser Pediatr Program.* 2008;61:91-102.
6. Khan NA. Role of lipids and fatty acids in macrosomic offspring of diabetic pregnancy. *Cell Biochem Biophys.* 2007;48(2-3):79-88.
7. Haggarty P. Placental regulation of fatty acid delivery and its effect on fetal growth--a review. *Placenta.* 2002;23(Suppl A):S28-38.
8. Bensinger SJ, Tontonoz P. Integration of metabolism and inflammation by lipid-activated nuclear receptors. *Nature.* 2008;454(7203):470-7.
9. Hihi AK, Michalik L, Wahli W. PPARs: transcriptional effectors of fatty acids and their derivatives. *Cell Mol Life Sci.* 2002;59(5):790-8.
10. Michalik L, Desvergne B, Dreyer C, Gavillet M, Laurini RN, Wahli W. PPAR expression and function during vertebrate development. *Int J Dev Biol.* 2002;46(1):105-14.
11. Desvergne B, Michalik L, Wahli W. Transcriptional regulation of metabolism. *Physiol Rev.* 2006;86(2):465-514.
12. Desvergne B, Michalik L, Wahli W. Be fit or be sick: peroxisome proliferator-activated receptors are down the road. *Mol Endocrinol.* 2004;18(6):1321-32.
13. Jawerbaum A, White V. Animal Models in Diabetes and Pregnancy. *Endocr Rev.* 2010 Oct;31(5):680-701.
14. Jawerbaum A, Capobianco E. Review: Effects of PPAR activation in the placenta and the fetus: implications in maternal diabetes. *Placenta.* 2011;32(Suppl 2):S212-7.
15. Wieser F, Waite L, Depoix C, Taylor RN. PPAR Action in Human Placental Development and



- Pregnancy and Its Complications. *PPAR Res.* 2008;2008:527048.
16. Lappas M, Hiden U, Desoye G, Froehlich J, Hauge-de Mouzon S, Jawerbaum A. The role of oxidative stress in the pathophysiology of gestational diabetes mellitus. *Antioxid Redox Signal.* 2011;15(12):3061-100.
17. Capobianco E, Jawerbaum A, Romanini MC, White V, Pustovrh C, Higa R, et al. 15-Deoxy-Delta12,14-prostaglandin J2 and peroxisome proliferator-activated receptor gamma (PPARgamma) levels in term placental tissues from control and diabetic rats: modulatory effects of a PPARgamma agonist on nitridergic and lipid placental metabolism. *Reprod Fertil Dev.* 2005;17(4):423-33.
18. Balsells M, Garcia-Patterson A, Gich I, Corcoy R. Maternal and fetal outcome in women with type 2 versus type 1 diabetes mellitus: a systematic review and metaanalysis. *J Clin Endocrinol Metab.* 2009;94(11):4284-91.
19. Melamed N, Hod M. Perinatal mortality in pregestational diabetes. *Int J Gynaecol Obstet.* 2009;104 Suppl 1:S20-4.
20. Ueda SM, Mao TL, Kuhajda FP, Vasoontara C, Giuntoli RL, Bristow RE, et al. Trophoblastic neoplasms express fatty acid synthase, which may be a therapeutic target via its inhibitor C93. *The American Journal of Pathology.* 2009;175(6):2618-24.
21. Wang Q, Fujii H, Knipp GT. Expression of PPAR and RXR isoforms in the developing rat and human term placentas. *Placenta.* 2002;23(8-9):661-71.
22. Lappas M, Hiden U, Desoye G, Froehlich J, Mouzon SH, Jawerbaum A. The role of oxidative stress in the pathophysiology of gestational diabetes mellitus. *Antioxid Redox Signal.* 2011;15(12):3061-100.
23. Jawerbaum A, Gonzalez E. Diabetic pregnancies: the challenge of developing in a pro-inflammatory environment. *Curr Med Chem.* 2006;13(18):2127-38.
24. Capobianco E, Martinez N, Higa R, White V, Jawerbaum A. The effects of maternal dietary treatments with natural PPAR ligands on lipid metabolism in fetuses from control and diabetic rats. *Prostaglandins Leukot Essent Fatty Acids.* 2008;79(6):191-9.
25. Jawerbaum A, Capobianco E, Pustovrh C, White V, Baier M, Salzberg S, et al. Influence of peroxisome proliferator-activated receptor gamma activation by its endogenous ligand 15-deoxy Delta12,14 prostaglandin J2 on nitric oxide production in term placental tissues from diabetic women. *Mol Hum Reprod.* 2004;10(9):671-6.
26. Holdsworth-Carson SJ, Lim R, Mitton A, Whitehead C, Rice GE, Permezel M, et al. Peroxisome proliferator-activated receptors are altered in pathologies of the human placenta: gestational diabetes mellitus, intrauterine growth restriction and pre-eclampsia. *Placenta.* 2010;31(3):222-9.
27. Martinez N, White V, Kurtz M, Higa R, Capobianco E, Jawerbaum A. Activation of the nuclear receptor PPARalpha regulates lipid metabolism in foetal liver from diabetic rats: implications in diabetes-induced foetal overgrowth. *Diabetes Metab Res Rev.* 2011;27(1):35-46.
28. Martinez N, Kurtz M, Capobianco E, Higa R, White V, Jawerbaum A. PPAR{alpha} agonists regulate lipid metabolism and nitric oxide production and prevent placental overgrowth in term placentas from diabetic rats. *J Mol Endocrinol.* 2011;47(1):1-12.
29. Schaiff WT, Barak Y, Sadovsky Y. The pleiotropic function of PPAR gamma in the placenta. *Mol Cell Endocrinol.* 2006;249(1-2):10-5.